

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-147993

(43)Date of publication of application : 13.06.1995

(51)Int.Cl.

C12P 41/00
// (C12P 41/00
C12R 1:05)

(21)Application number : 05-296419

(71)Applicant : DAISO CO LTD

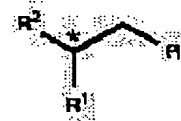
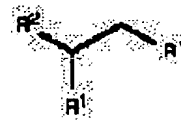
(22)Date of filing : 26.11.1993

(72)Inventor : SUZUKI TOSHIO
KASAI NAOKA
MINAMIURA YOSHICHIKA

(54) PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE 1,2-DIOLS AND HALOGENOHYDRIN USING AN ENZYME FROM MICROORGANISM

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable simple synthesis of the compound useful as an intermediate for medicines, agrochemicals and ferroelectric liquid crystal by allowing an oxidative dehalogenation enzyme such as dehalogenase to act on specific 1,2-diol or racemic halogenohydrin. CONSTITUTION: Racemic 1,2-diol of formula I [R1 is OH, halogen; R2 is alkyl, alkenyl, aryl which may be substituted; when R1 is OH; or CH2OH, when R1 is halogen] such as 1,2-propanediol or a halogenohydrin such as 3-chloro-1,2-propanediol is treated with dehalogenase, an oxidative dehalogenase, for example, halo-hydrin dehydro-dehalogenase to provide the objective optically active compound used in medicines, agrochemicals and ferroelectric liquid crystals or as an intermediate therefor.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.03.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3077478

[Date of registration] 16.06.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-147993

(43)公開日 平成7年(1995)6月13日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 P 41/00

C 9452-4B

// (C 1 2 P 41/00

C 1 2 R 1:05)

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願平5-296419

(22)出願日 平成5年(1993)11月26日

(71)出願人 000108993

ダイソー株式会社

大阪府大阪市西区江戸堀1丁目10番8号

(72)発明者 鈴木 利雄

大阪府堺市北野田226-4

(72)発明者 笠井 尚哉

大阪府泉南郡熊取町大久保1070-87

(72)発明者 南浦 能至

奈良県香芝市瓦口1130-2

(74)代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

(54)【発明の名称】 微生物酵素による光学活性1, 2-ジオール類およびハロゲノヒドリン類の製造法

(57)【要約】

【目的】 光学活性1, 2-ジオール類およびハロゲノヒドリンの製造法を提供する。

【構成】 下記一般式[1]で示されるラセミ体化合物に、酸化的脱ハロゲン化酵素であるデハロゲナーゼを作らせると、下記一般式[2]で示される光学活性体化合物を製造することができる。

【化1】



(一般式[1], [2]において、R¹は共に-OHまたはハロゲン原子であり、R²は、R¹が-OHのときは置換もしくは無置換のアルキル基、アルケニル基及びアリール基より選ばれた基であり、R¹がハロゲン原子のときは-CH₂OHであり、*印は不斉炭素を表わす)。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式[1]で示される1,2-ジオール類またはハロゲノヒドリン類のラセミ体化合物に、酸化的脱ハロゲン化酵素であるデハロゲナーゼを作用させることを特徴とする一般式[2]で示される光学活性体化合物の製造方法:

【化1】



(一般式[1],[2]において、R¹は共に-OH又はハロゲン原子であり、R²はR¹が-OHのときは置換もしくは無置換のアルキル基、アルケニル基及びアリール基より選ばれた基であり、R¹がハロゲン原子のときは-C₂H₄OHであり、*印は不斉炭素を表わす)。

【請求項2】 R¹が-OHである請求項1記載の方法。

【請求項3】 R²が無置換のアルキル基、アルケニル基及びアリール基より選ばれた基である請求項2記載の方法。

【請求項4】 一般式[1]の化合物が1,2-プロパンジオール、1,2-ブタンジオール、1,2-ペンタンジオール、1,2-ヘキサンジオール、1,2-ヘプタンジオール、1,2-オクタンジオール、1-フェニル-1,2-エタンジオール、1,2-ジヒドロキシ-3-ブテン、または1,2-ジヒドロキシ-5-ヘキセンのラセミ体である請求項3記載の方法。

【請求項5】 R²が置換アルキル基である請求項2記載の方法。

【請求項6】 一般式[1]の化合物が3-ハロゲノ-1,2-プロパンジオールのラセミ体である請求項5記載の方法。

【請求項7】 一般式[1]の化合物が3-クロロ-1,2-プロパンジオール又は3-ブロモ-1,2-プロパンジオールのラセミ体である請求項6記載の方法。

【請求項8】 R¹がハロゲン原子である請求項1記載の方法。

【請求項9】 一般式[1]の化合物が2,3-ジクロロ-1-プロパノール又は2,3-ジブロモ-1-プロパノールのラセミ体である請求項8記載の方法。

【請求項10】 デハロゲナーゼが *Alcaligenes* sp. DS-S-7 G株由来のハロヒドリンデハイドロ-デハロゲナーゼである請求項1~9いずれかに記載の方法。

【請求項11】 酵素反応を促進させるために電子受容体化合物を添加して行なう請求項1~10いずれかに記載の方法。

【請求項12】 電子受容体化合物がニコチンアミドアデニンジヌクレオチド、ニコチンアミドアデニンジヌク

レオチドリン酸、フェナジンメソサルフェイト、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール、m-ブロモフェノールインドフェノール、2,6-ジクロロフェノール-O-クレゾール、メチレンブルー、メチルピオロゲン、ブチルピオロゲン、ベンゾキノン、テトラゾリウム化合物又はフェリシアン化塩である請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

10 【0001】 本発明は医薬、農薬、及び強誘電性液晶などに使用される光学活性化合物またはその中間体の合成における有用なキラルビルディングブロックと成りうる光学活性1,2-ジオール類およびハロゲノヒドリン類の、酵素を用いた新規製造法に関するものである。

【従来技術と問題点】

【0002】 光学活性1,2-ジオール類の製法に関しては、化学的方法として光学活性アミノ酸をα-ヒドロキシ酸に変換した後、1,2-ジオール類に還元する製法(日本化学雑誌、91巻、pp. 265, 1970)と光学活性1,2-エポキシグリシジル誘導体をアルキル金属化合物により相当する光学活性1,2-ジオール類へ開環する製法(特開平1146834)が知られている。しかしこれらの製法により高光学純度の1,2-ジオール類を得るためには、高光学純度を持つ原料を必要とし、工業的に安価で経済的な製法とはいえない。また、生物学的製法ではLeeとWhitesidesによるグリセロールデヒドロゲナーゼを用いた1-ヒドロキシ-2-プロパノールおよび1-ヒドロキシ-2-ブタノールからの還元反応による(R)体1,2-プロパンジオールおよび(R)体1,2-ブタンジオールの製法が知られている(Journal of Organic Chemistry, Vol. 51, pp. 25-36, (1986))。しかしながら、安価なラセミ体1,2-ジオールから光学活性体を得る方法は知られていない。また、微生物を用いた方法では1-ヒドロキシ-2-ケトン化合物に微生物菌体を用いて作用させ、(S)体1,2-ジオールに変換する製法(特開平1-320988)が知られているが、(R)体1,2-ジオール類を得る方法は知られていない。光学活性ハロゲノヒドリン類、例えば(S)体3-ハロゲノ-1,2-プロパンジオールの製法に関しては、化学的方法としてメチル-6-デオキシ-α-D-グルコピラノシドから合成する方法(Chemistry & Industry, Vol. 15, pp. 533(1978))、およびD-マンニトールからの製法が知られている(Chemico-Biological Interactions, Vol. 41, pp. 95-104(1982))が、高度な技術と複雑な工程を必要とし工業的製法とはいえない。生物学的製法としては、酵素を用いた方法と微生物を用いた方法が知られている。酵素を用いた方法としては真菌類のリパーゼを用いた3-クロロ-1,2-プロパンジオールとトリグリセリドとのエステル交換反応による光学

活性3-クロロ-1,2-プロパンジオールとそのエステルの製法が知られている(特開平3-53885)。また、細菌のデハロゲナーゼを作用させ、1,3-ジハロゲノ-2-プロパノールから(S)体3-クロロ-1,2-プロパンジオールに変換させる方法が知られている(特開平1-94638、特開平4-94690、特開平5-068587)。しかしながら、従来知られている酵素法で得られる(S)体3-クロロ-1,2-プロパンジオールの光学純度は低く、高光学純度の(S)体3-クロロ-1,2-プロパンジオールの製法としては更に改良する必要がある。微生物を用いた方法では、ラセミ体3-クロロ-1,2-プロパンジオールより一方の(R)体を資化させ、残存する(S)体を回収する製法が知られている(微生物資化法)(特許公報平4-73999)。微生物による資化法はラセミ体3-クロロ-1,2-プロパンジオールを炭素源として純粋培養を行なうため、滅菌等の複雑な工程を必要とし、反応に際しては長時間を必要とするなどの問題が残されている。従って、高光学純度で且つ簡便な(S)体3-クロロ-1,2-プロパンジオールを得るための製法の開発が望まれている。

【0003】光学活性2,3-ジハロゲノ-1-プロパノールの製法としては、微生物や酵素を用いる方法が知られている。微生物を用いる方法では、ラセミ体2,3-ジクロロ-1-プロパノールを炭素源とし、一方の(S)体を資化させ、残存する(R)体を回収する製法(資化法)が知られている(Journal of Industrial Microbiology, Vol. 10, pp. 37-43(1990), 特開平2-25789)。酵素を用いる方法では、真菌類および動物のリパーゼを作用させたラセミ体2,3-ジクロロ-1-プロパノールとトリブチリンを基質としたエステル交換反応による(S)体とその(R)体ブチルエステルの製法が知られている(特開平1-47397, Journal of American Chemical Society, Vol. 106, pp. 2687-2692(1984))。微生物を用いる方法は、仕込み反応濃度が低く、微生物資化法であるため滅菌などの複雑な工程を必要とする。また、酵素を用いる方法は、生成する(R)体のブチルエステルの光学純度が低いという欠点がある。この様に、両方法とも高光学純度且つ工業的に簡便な(R)体2,3-ジハロゲノ-1-プロパノールの製法とはいえない。

【課題を解決するための手段】

【0004】本発明者らは、これらの課題を解決すべく光学活性1,2-ジオール類、および光学活性ハロゲノヒドリン類の工業的生産を目指して鋭意研究した結果、以下の事実を見出した。すなわち、本発明者らが土壌より分離した細菌 *Alcaligenes* sp. DS-S-7 G株由来の酸化的脱ハロゲン反応を触媒するデハロゲナーゼの作用により、安価なラセミ体1,2-ジオール類また

はハロゲノヒドリン類から、(S)あるいは(R)体1,2-ジオール、または(S)体ハロゲノヒドリン類が分解除去され、(R)あるいは(S)体1,2-ジオール類、または(R)体ハロゲノヒドリン類が残存回収されることが判明した。本発明は、かかる知見に基づき完成されたものである。

【0005】本発明方法は、緩衝液と基質だけを含む簡単な反応液で反応を行なうことができる。また、本発明方法は酵素を用いる方法であるため、反応基は簡単な攪拌槽を用いることができ、微生物を培養するような培養基(ジャーフェメンター)を使用する必要がない。更には加圧滅菌をする必要もなく簡便で且つ安価な方法である。

【0006】即ち本発明は、下記一般式[1]で示されるラセミ体1,2-ジオール類またはハロゲノヒドリン類から、一方の光学異性体を酸化立体選択的に分解するか、または酸化的立体的に脱ハロゲン化し、残存する下記一般式[2]で示される1,2-ジオール類またはハロゲノヒドリン類の光学異性体を回収することからなる光学活性体化合物の製造方法を提供するものである：

【化2】



(上記一般式[1]、[2]において、R'は共に-OH又はハロゲン原子であり、R²はR'が-OHのときは置換もしくは無置換のアルキル基、アルケニル基及びアリール基より選ばれる基であり、R'がハロゲン原子のときは-CH₂OHであり、*印は不斉炭素を表わす)。

【0007】本発明で使用し得るデハロゲナーゼとしては、具体的には本発明者らにより土壌から分離されたアルカリゲネス属に属する微生物 *Alcaligenes* sp. DS-S-7 G株の産生するデハロゲナーゼを挙げることができる。上記微生物は既に工業技術院微生物工業研究所に微工研菌寄11111号(FERMP-11111)として寄託されている。本発明方法に用いる酵素は、*Alcaligenes* sp. DS-S-7 G株より(R)体3-クロロ-1,2-プロパンジオールを脱ハロゲン化する活性を指標に酵素を分離・精製した結果得られたものであり、ハロヒドリンデハイドロ-デハロゲナーゼと命名された。この酵素は、次の様な酵素化学的諸性質を示す。

【0008】(R)体3-クロロ-1,2-プロパンジオールを酸化的に脱ハロゲン化し、補酵素としてNAD⁺(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)又はNADP⁺(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸)を必要とする。また、好氣的条件下において酸素を電子受容体とする。更に、興味深いことに、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)やフェナジメ

ソサルフェイト(PMS)又はそれらの混合物を人工的な電子受容体として用いた場合、(R)体3-クロロ-1,2-プロパンジオールに対する酸化的脱ハロゲン化活性はNAD⁺を補酵素とした場合と比較すると約1000倍に上昇した。そこでPMSを補酵素として種々ハロヒ*

*ドリンに対する酸化的脱ハロゲン化活性を測定したところ、表1の結果を得た。

【0009】

【表1】

本酵素による種々の1,2-ジオール類、ハロゲノヒドリン類、アルコール化合物および酸に対するデハロゲナーゼ活性およびデヒドロゲナーゼ活性

基質	相対活性(%)
(R)-3-クロロ-1,2-プロパンジオール	100
(S)-3-クロロ-1,2-プロパンジオール	<5
ブromo-1,2-プロパンジオール	50
(R)-2,3-ジクロロ-1-プロパノール	<5
(S)-2,3-ジクロロ-1-プロパノール	57
2,3-ジブromo-1-プロパノール	94
1,3-ジクロロ-2-プロパノール	19
3-クロロ-1-プロパノール	8
エチレンクロロヒドリン	<5
プロピレンクロロヒドリン	14
ブチレンクロロヒドリン	65
4-クロロ-3-ヒドロキシブチロニトリル	11
1-クロロプロパン	0
α -クロロプロピオン酸	0
β -クロロプロピオン酸	0
クロロアセトン	0
1,3-ジクロロアセトン	0
エピクロロヒドリン	<5
メタノール	<5
エタノール	<5
n-プロパノール	7
sec-プロパノール	<5
エチレングリコール	11
1,2-プロパンジオール	31
1,3-プロパンジオール	<5
1,2-ブタンジオール	36
2,3-ブタンジオール	7
1,2-ペンタンジオール	32
1,2-ヘキサンジオール	43
1,2-ヘプタンジオール	30
1,2-オクタンジオール	28
1,2-ジヒドロキシー-3-ブテン	16
1,2-ジヒドロキシー-5-ヘキセン	60
1-フェニル-1,2-エタンジオール	8
3-フェニル-1,2-プロパンジオール	13
3-フェノキシー-1,2-プロパンジオール	<5
ヒドロキシアセトン	48
グリシドール	<5
グリセロール	7
フォルムアルデヒド	6
乳酸	<5
酢酸	0

本酵素の(R)体3-クロロ-1,2-プロパンジオールに対する酸化的脱クロル化活性(3.18 U/mg)を100%として示す。

【0010】また、無置換アルコール化合物に対してはデヒドロゲナーゼ活性を示すことも判明した。特に、いくつかの1,2-ジオール化合物に対しては高い活性を示すだけでなく、実施例にも示す様に高い立体選択性を示すことが判明した。一方、*Alcaligenes* sp. DS-S-7 G株は(R)体3-ハロゲノ-1,2-プロパンジオール又はそのラセミ体を単一炭素源として生育することができ、実施例において示す様な他の1,2-ジオールやハロヒドリンを単一炭素源としては生育することができなかった。すなわち、以上の結果は菌体より酵素を分離・精製して初めて判明した事実である。更に、*

本酵素のアミノ酸組成

アミノ酸	本酵素1モルあたりのアミノ酸残基数 ¹⁾
アスパラギン酸	65
スレオニン ²⁾	30
セリン ²⁾	35
グルタミン酸	45
グリシン	55
アラニン	60
バリン	40
メチオニン	15
イソロイシン ³⁾	20
ロイシン	50
チロシン	15
フェニルアラニン	25
リジン	20
ヒスチジン	15
アルギニン	40
プロリン	40
トリプトファン ⁴⁾	50
1/2シスチン ⁵⁾	5

酵素85 µgを6 N塩酸中において減圧封管した後、110℃で24時間、48時間、72時間加水分解処理を行なった。

1) 本酵素の分子量を70,000として計算した残基数である。

2) 加水分解率より0時間に相当する値を基に計算した。

3) 加水分解72時間の値を基に計算した。

4) 紫外外部吸収値より分光光学的に計算した。

5) 酵素を過キ酸酸化処理を行ない、システイン酸として計算した。

【0012】等電点(pI)は5.4で、PMSを補酵素とし、(R)体3-クロロ-1,2-プロパンジオールを基質とした場合、そのKm値はPMSに対して78.1 µM、(R)体3-クロロ-1,2-プロパンジオールに対して322 µMで、Vmaxは3.34 µmol/mg/分あ

*本酵素は学術的に大変興味深い酵素化学的性質及び基質特異性を有しており、ハロヒドリン化合物に対して酸化的脱ハロゲン化反応を触媒する作用を有しており、かかる酵素は未だ知られていない。本酵素の分子量はポリアクリルアミド電気泳動から約70,000と決定され、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動により約58,000と約16,000の2種のポリペプチド鎖からなるサブユニット構造をとっていること、また1酵素分子内に約1分子のフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)を非共有的に結合していることが判った。表2に本酵素のアミノ酸組成を示す。

【0011】

【表2】

た。最適pHは7.2~7.4、pH安定性はpH6~8、最適温度45℃、温度安定性は~40℃であった。また、本酵素の酸化的脱ハロゲン化活性は、Cu²⁺、Hg²⁺、p-クロロ安息香酸第2水銀(PCMB)で完全に阻害された。上記微生物*Alcaligenes* sp. DS-S-7 G株を培養するための培地組成としては、通常これらの微生物が生育する培地ならば何でも使用することができる。例えば炭素源としてグリセロール、ラセミ体3-ハロゲノ-1,2-プロパンジオール、(R)体3-ハロゲノ-1,2-プロパンジオール等のアルコール類、酢酸、クエン酸、リンゴ酸、マレイン酸、フマル酸、グルコン酸とその塩類などの有機酸、またはそれらの混合物を、窒素源としては、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機窒素化合物および尿素、ペプトン、カゼイン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカー等の有機窒素化合物とそれらの混合物

を挙げることができる。その他、無機塩としてリン酸塩、マグネシウム塩、カリウム塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩など、更に必要に応じてビタミン類を加えてもよい。また、高酵素活性を持った菌体を得るために、木菌株を培養する際に上記培地およびペプトン培地、ブイヨン培地等の栄養培地にラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオール、(R)体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを添加してもよい。ラセミ体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールまたは(R)体3-ハロゲノ-1, 2-プロパンジオールを単一炭素源とする完全合成培地で培養するのも有効である。

【0013】上記微生物の培養は常法によればよく、例えばpHを4~9、好ましくは4.5~8.5、培養温度は20~45℃、好ましくは25~37℃の範囲で好氣的に10~96時間行なうことが好ましい。

【0014】ラセミ体1, 2-ジオール類またはハロゲノヒドリン類に酵素を作用させて(R)あるいは(S)体2-ジオール類、または(R)体ハロゲノヒドリン類を得るには、本発明による微生物酵素に基質を添加すればよい。反応温度は15~50℃が好ましく、反応pHはpH6~9で行なうのが好ましい。反応液中の基質濃度は0.1~15%(v/v)が好ましく、基質は初期に一括していても良いし、分割添加しても良い。反応は通常攪拌あるいは振とうしながら行ない、反応時間は基質濃度、酵素量により異なるが1~120時間で終了するのが良い。好ましくはガスクロマトグラフィー等の分析により残存基質量が初期基質濃度に比して50%で反応を終了するのが良い。また、反応を促進的に行なうために、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリノ酸(NADP⁺)、フェナジンメソサルフェイト(PMS)、2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)、m-ブロモフェノールインドフェノール、2, 6-ジクロロフェノール-O-クレゾール、メチレンブルー、メチルピオロゲン、ブチルピオロゲン、ベンゾキノン、テトラゾリウム化合物(テトラゾリウムバイオレット、テトラニトロブルーテトラゾリウム、またはイオドニトロテトラゾリウム)、フェリシアン化塩等の電子受容体化合物またはその混合物を上記酵素反応に添加しても良い。

【0015】このようにして反応液中に残存した(R)あるいは(S)体1, 2-ジオール類またはハロゲノヒドリン類は一般的な方法で回収および精製できる。例えば反応液を遠心分離した後、上清をエバポレーターにより濃縮し、酢酸エチル等の溶媒で抽出する。抽出液を無水硫酸マグネシウムにより脱水した後、減圧下で溶媒を除去し、(R)あるいは(S)体1, 2-ジオール類、または(R)体ハロゲノヒドリン類のシロップを得ることができる。更に蒸留により精製しても良い。

【0016】尚、上記酵素は精製品を用いてもよいが、

Alcaligenes sp. DS-S-7G株の培養液、遠心分離により得た菌体およびその処理物(菌体破砕物または菌体抽出液)またはそれらを固定化したものを用いても上記の反応を進行させることができる。以下実施例をもって、本発明を詳細に説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。なお、実施例中の%は特に記載のない限り(W/V)を表す。

【実施例】

【0017】実施例1

10 リン酸第2ナトリウム0.02%、リン酸第2カリウム0.02%、リン酸第1ナトリウム0.04%、硫酸アンモニウム0.37%、コーンステープリカー0.1%、硫酸マグネシウム0.05%および微量の硫酸鉄、硫酸マンガン、硫酸銅(pH6.5)からなる組成の培地2.5lを入れた5lジャーフェーマンター(培養器)を121℃、15分滅菌した。その培地にラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを1.5%(v/v)になるように添加し、ラセミ体3-クロロ-1, 2-プロパンジオールを炭素源とする培地を作成した。次に、*Alc*

20 *aligenes* sp. DS-S-7G株を予めペプトン、酵母エキス、グリセロールをそれぞれ1.0%含む栄養培地(pH7.2)で30℃、16時間振とう培養し、上記培地に2%(v/v)量無菌的に接種した。そして温度30℃、通気量0.5l/分、回転数500rpmの条件で約72時間、通気攪拌培養を行なった。pHの測定および制御は連動させたpHメーターで行ない、5Nの水酸化ナトリウムによりpH6.5に制御した。

【0018】培養終了後、培養液を取り出して遠心分離にて集菌し、50mMリン酸緩衝液(pH7.2)で3回洗浄した。菌体を同緩衝液100mlにけん濁し、超音波破砕器により菌体を破砕した後、遠心分離により沈殿を除去し、その上清を粗酵素液とした。更に、硫酸アンモニウムを添加して分画(粗精製)し、最終的に50mlの20mMリン酸緩衝液、pH7.2に溶解した。その酵素液に0.2%(v/v)のラセミ体1, 2-ブタンジオールを加え、更に0.5mMとなるようにフェナジンメソサルフェイト(PMS)と2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール(DCIP)をそれぞれ添加し、30℃で攪拌しながら4時間反応させた。その時の反応液中に残存する

40 1, 2-ブタンジオールをガスクロマトグラフィー(カラム担体:PEG20M, 60-80メッシュ)で分析した結果、その残存率は48.2%であった。反応終了後、約1mlまで濃縮し、酢酸エチルで抽出した。無水硫酸マグネシウムにより脱水後、減圧下で溶媒を除去し、40.1mgの1, 2-ブタンジオールのシロップを得た(回収率40.8%)。

【0019】得られた物質の同定をガスクロマトグラフィーにより行なったところ、1, 2-ブタンジオールの存在を確認した。このシロップ中の1, 2-ブタンジオールを無水トリフルオロ酢酸によりトルフルオロアセチ

ル化した後、アステック社製のキャピラリーカラムG-TA(0.25mm×30m)を用いたガスクロマトグラフィーにより光学異性体の分析を行なった。その結果、回収した1,2-ブタンジオールは光学純度97.5%eeの(R)体であることが判明した。この分析により(R)体の保持時間は10.8分、(S)体は14.0分であった。なお、上記のガスクロマトグラフィーによる光学異性体の分析条件は以下の通りである。

分析条件: カラム温度, 70℃; 検出器温度, 150℃; キャリアーガス, 窒素; 流速, 1ml/分; 検出器, FID; スプリット比, 100/1。

【0020】実施例2-13

基質を1,2-ブタンジオールから以下に示す表3の基質に変えた以外は実施例1と同様の方法で酵素反応を行なった。また、得られた種々の化合物を実施例1と同様の方法で種々の分析を行なったが、実施例9の、基質が1-フェニル-1,2-エタンジオールについては、その光学異性体の分析はダイセル社製キラルセルOB

(0.46mm×26cm)を用いて行なった。また、実施例12、13の基質2,3-ジハロゲノ-1-プロパノール *20

*ルおよび2,3-ジブromo-1-プロパノールについては、その光学異性体の分析は水酸化ナトリウムでそれぞれのエピハロゲノヒドリンに変換した後、Schurigの方法(Journal of Chromatography, Vol. 441, pp. 135-153(1988))により作製したキャピラリーカラム(0.25mm×30m)を用いたコンプレグゼーションガスクロマトグラフィーにより分析した(Journal of Industrial Microbiology, Vol. 10, pp. 37-43(1992))。なお、上記実施例9と実施例12、13の光学異性体の分析条件は下記に示す通りである。

実施例9の光学異性体分析条件: カラム温度, 25℃; 検出器; UV235nm; 展開溶媒, ヘキサン/2-プロパノール

(30/1); 流速, 1ml/分。

実施例12、13の分析条件: カラム温度, 70℃; 検出器温度, 150℃; キャリアーガス, 窒素; 流速, 1ml/分; 検出器, FID, スプリット比, 100/1

【0021】

【表3】

実施例	基質	残存物	光学純度(%ee)	残存率(%)
2	ラセミ体1,2- プロパンジオール	R体	60.0	42.3
3	ラセミ体1,2- ペンタンジオール	R体	98.2	50.2
4	ラセミ体1,2- ヘキサンジオール	R体	98.2	50.0
5	ラセミ体1,2- ヘプタンジオール	R体	97.5	47.3
6	ラセミ体1,2- オクタンジオール	R体	96.8	45.9
7	ラセミ体1,2-ジハイドロキシ -3-ブテン	R体	98.0	49.1
8	ラセミ体1,2-ジハイドロキシ -5-ヘキセン	R体	98.3	40.1
9	ラセミ体1-フェニル-1,2- エタンジオール	R体	95.1	39.5
10	ラセミ体3-クロロ-1,2- プロパンジオール	S体	98.5	50.2
11	ラセミ体3-ブromo-1,2- プロパンジオール	S体	98.5	49.3
12	ラセミ体2,3-ジクロロ-1- プロパノール	R体	99.0	46.2
13	ラセミ体2,3-ジブromo-1- プロパノール	R体	99.0	48.1

注) 表中の残存率は0.3%の誤差を含むものとする。

【発明の効果】

【0022】本発明によれば、アルカリゲネス属に属する微生物 *Alcaligenes* sp. DS-S-7Gの生産する

酵素、ハロヒドリンデハイドローデハロゲナーゼを利用して、ラセミ体1,2-ジオール類またはハロゲノヒドリン類から(S)あるいは(R)体1,2-ジオール類または(S)体ハロゲノヒドリン類を分解除去することにより、(R)あるいは(S)体1,2-ジオール類または(R)

体ハロゲンヒドリン類を製造することができる。